

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻

平成 17 年度博士課程 進学

氏 名 菅又 龍一

指導教員名 鈴木 謙

論文題目 魚類の抗原提示細胞

増養殖の現場では魚病対策として、しばしばワクチン投与が行われているが、その有効性を高めるためには、魚類の免疫系に関する深い理解が必須であり、様々な研究が精力的に行われている。そうした中で、免疫応答の出発点として、病原生物を取り込み、その抗原情報を T 細胞に提示する抗原提示細胞を魚類で初めて明らかにしたのが本研究である。

哺乳動物では、単球や樹状細胞といった抗原提示細胞が、生体内に侵入した病原生物を細胞内に取り込み、消化したペプチド断片を結合させた MHC クラス II 分子を細胞表面に提示し、ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) にその情報を伝える。Th 細胞がその抗原を異物として認識すると、B 細胞を活性化して抗原特異的な抗体を産生するようになり、獲得免疫応答が誘導される。抗原提示細胞は抗原を提示する MHC クラス II 分子と、T 細胞の活性を制御する共刺激分子によって特徴付けられる。近年の研究の進展により、魚類の T 細胞や B 細胞に関する知見が急速に増加してきたが、初期免疫応答の理解のためには、残る抗原提示細胞の解明が急務となっていた。そこで本研究では、魚類獲得免疫機構の基盤を明らかにするために、ゲノムデータベースの利用が可能で、また各白血球集団を精製するのに十分な体サイズをもつトラフグを材料に用い、共刺激分子 B7 ファミリーを指標に、魚類で初めて抗原提示細胞の存在を明らかにし、その機能の解明を目指した。

## 第一章 トラフグ抗原提示細胞マーカー遺伝子の構造と発現解析

ヒトやマウスの抗原提示細胞は、MHC クラス II や、共刺激分子である B7 や CD40 を細胞膜上に共発現している。特に高い抗原提示能をもつ樹状細胞では、さらにこの他に DEC-205、CD83、CD11 などの特異的な細胞表面マーカーをもつことが知られている。そこでトラフグゲノムデータベースから、これらの遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を示す配列を検索し、その配列に基づくプライマーを用いて、魚類の主要な二次リンパ器官である頭腎を材料に RACE 法による cDNA クローニングを行った。その結果、トラフグの MHC クラス II $\alpha$ 、B7-H1/DC、B7-H3、B7-H4、CD40、DEC-205、CD83、CD11 の cDNA を単離し、一次構造を決定した。B7 ファミリー、DEC-205 や CD11 遺伝子の同定は魚類では初めてのことであり、進化の過程において魚類の段階ですでに哺乳類と同様の抗原提示細胞の機能に関わる細胞表面分子がほぼ存在していることが明らかとなった。B7 としては 3 種類認められたが、これらのうち B7-H1/DC はシンテニー解析や系統樹解析から、哺乳類の B7-H1 と B7-DC の両方と類似した分子であると考えられた。RT-PCR 法により、これらの遺伝子は、トラフグの胸腺、頭腎、体腎、脾臓などのリンパ器官や、皮膚や腸などの粘膜組織における発現が認められたことから、魚類ではこれらの組織に抗原提示細胞が分布することが示唆された。

## 第二章 トラフグ共刺激分子 B7 ファミリーの発現細胞の同定と機能解析

ヒトやマウスでは共刺激分子である B7 が抗原提示細胞の指標として利用されている。そこで、魚類抗原提示細胞マーカーの候補として B7 ファミリー分子を発現する細胞を特定すると共に、この分子の T 細胞に対する刺激能を検討した。

トラフグの B7 ファミリー分子を発現する細胞を同定するために、トラフグ B7-H1/DC、B7-H3、B7-H4 とヒト IgG1 の Fc 領域とを連結させた Fc 融合組換え体 (B7-H1/DC-Ig, B7-H3-Ig, B7-H4-Ig) を、昆虫細胞を用いて作製した。この組換え体を免疫抗原としたラット抗トラフグ B7-Ig 血清を用いて、これらの B7 分子を細胞膜上に発現する白血球を FACS 解析で探索したところ、3 種類の B7 タンパク質はトラフグの B 細胞や T 細胞では発現せず、に単球を Lipopolysaccharide (LPS) で刺激した際に、その膜上に発現が誘導されることが明らかになった。さらに Magnetic beads cell sorting (MACS) 法により単離した各 B7<sup>+</sup>単球における遺伝子の発現様態を RT-PCR 法で調べたところ、B7 ファミリー分子だけでなく抗原提示に必要な MHC クラス II $\alpha$  遺伝子を発現していたことから、魚類の B7<sup>+</sup>単球が共刺激と抗原提示を行う抗原提示細胞であることが推察された。またこの B7<sup>+</sup>単球は CD8 $\alpha$ 、DEC-205、CD83 などの樹状細胞マーカーを発現しており、この細胞集団の中に樹状細胞が内在する可能性も示された。

続いて、B7 の標的細胞が T 細胞であることを確かめるために、トラフグ末梢血白血球 (PBLs) から単離した T 細胞に B7-Ig を作用させた後、FITC 標識抗ヒト IgG を用いたフローサイトメトリー (FACS 解析) により、B7 と T 細胞の結合を調べた。3 種類の B7-Ig は

phytohaemagglutinin (PHA) で活性化した T 細胞上に結合することが明らかとなり、T 細胞膜上に B7 受容体が発現することが示唆された。次に B7 の T 細胞の活性化に対する制御能を明らかにするために、B7-Ig 存在下で PHA 刺激した T 細胞を培養し、T 細胞の増殖活性を BrdU (5'-bromo-2-deoxyuridine) 取り込み法で、また同時に T 細胞におけるサイトカインの発現をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、B7-H1/DC は T 細胞の増殖を抑制するとともに、IL-10 と 2 つの IFN- $\gamma$  の発現を促進した。逆に B7-H3 と B7-H4 は T 細胞の増殖を促進するとともに、IL-2 の発現を促進し、IL-10 の発現を抑制するなど、B7 分子内で T 細胞に対する機能の多様性が示された。このように B7 は魚類においても T 細胞の増殖やサイトカイン産生能を制御する共刺激分子であることが示され、抗原提示細胞の指標として有効であることがわかった。

### 第三章 CD8 $\alpha$ を発現するトラフグ抗原提示細胞の機能解析

魚類では、最も強い抗原提示力をもつ樹状細胞 (DC: Dendritic Cells) がまだ見つからない。哺乳類では一部の樹状細胞が、細胞傷害性 T 細胞のマーカーとして知られる CD8 $\alpha$  を発現することが知られているが、これまでの研究でトラフグにも CD8 $\alpha$  を発現する単球が存在することがわかっている。そこでこの CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>単球の抗原提示細胞としての機能を検討することとした。

まず LPS 刺激したトラフグの単球から、ラット抗トラフグ CD8 $\alpha$ 血清を用いた MACS 法によって、CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>細胞と CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>細胞とを分離した。これら 2 つの細胞集団はともに MHC クラス II $\alpha$  と B7 や CD40 遺伝子を発現していたが、CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>細胞ではさらに CD83 や DEC-205 といった樹状細胞マーカーの発現も認められた。次に CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>細胞の細胞膜を PKH26 red 蛍光で染色し、共焦点レーザー顕微鏡でその形態を観察したところ、樹枝上の細胞形態を示すことがわかったことから CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DC 様細胞と名付けた。CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DC 様細胞と CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>単球の蛍光ビーズに対する貪食能を FACS 解析したところ、どちらの細胞も、哺乳類の抗原提示細胞である単球や樹状細胞と同様に、貪食能をもつことがわかった。これらの細胞の抗原提示能を明らかにするために、同種異系 T 細胞との混合白血球反応により、T 細胞増殖を誘導するかどうかが BrdU 取り込み法で調べた。その結果、トラフグ CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DC 様細胞と CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>単球はともに、MHC クラス II 不適合で起こる模擬的な抗原提示によって、同種異系 T 細胞増殖を誘導したことから、これらの細胞が T 細胞に対して抗原提示と共刺激をおこなうトラフグの抗原提示細胞であると結論した。さらに CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DC 様細胞は、CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>単球よりも強く T 細胞増殖を促進したこと、樹状細胞マーカー遺伝子を発現していることを考えあわせると、哺乳類における知見と同様に、この細胞が単球よりも強い抗原提示能を引き起こすことのできる樹状細胞サブセットの一つであることが推察された。

以上、全ゲノムが解読されたトラフグを用いることで、抗原提示細胞マーカー遺伝子を網羅的に検索した本研究において、共刺激分子である B7 ファミリー分子に着目することに

より、魚類で初めて抗原提示細胞の存在を明確にし、その機能の一端を明らかにすることができた。今回明らかにした抗原提示細胞は、形態的には単球であり、MHCクラスIIを持つ点で、哺乳類のそれと合致する。B7ファミリー分子としては、B7-H1/DC、B7-H3、B7-H4の3分子が認められたが、後2者がT細胞の活性化を促進するのに対し、前者は抑制的に働き、これらの分子が免疫応答の制御に密接に関わっていることが明らかとなった。さらにB7<sup>+</sup>抗原提示細胞の中でも、CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>細胞は樹状細胞マーカーを特異的に発現していたことやその形態から、魚類における樹状細胞の一つであると推察された。本研究により、獲得免疫系の基点となる抗原提示細胞に関する理解が深まったことは、免疫増強や、ワクチンの有効性の向上という増養殖産業からの要求解決に資するものであり、今後、応用的側面からの研究を加速していくことが重要である。